

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USP)**

B17



⑪ Veröffentlichungsnummer: **0 445 626 A2**

② **EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG**

④ Anmeldenummer: 91102805.8

⑤ Int. Cl. 5: **G01N 33/86, C12Q 1/56**

⑥ Anmeldetag: 26.02.91

① Priorität: 03.03.90 DE 4006634

④ Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
11.09.91 Patentblatt 91/37

⑧ Benannte Vertragsstaaten:  
**AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE**

⑦ Anmelder: **BEHRINGWERKE**  
**Aktiengesellschaft**  
Postfach 1140  
W-3550 Marburg 1(DE)

⑦ Erfinder: **Fickenschner, Karl, Dr.**  
Sonnenweg 8  
W-3550 Marburg(DE)

⑦ Vertreter: **Klein, Otto, Dr. et al**  
**Hoechst AG Zentrale Patentabteilung**  
Postfach 80 03 20  
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

④ **Funktioneller Test zur Bestimmung der Protein S-Aktivität**

⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur funktionellen Bestimmung von Protein S in Flüssigkeiten, insbesondere in Plasma, sowie ein hierfür geeignetes Reagenz.

EP 0 445 626 A2

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur funktionellen Bestimmung von Protein S in Flüssigkeiten, insbesondere in Plasma, sowie ein hierfür geeignetes Reagenz.

Protein S ist ein Inhibitor der Blutgerinnung und wirkt als Kofaktor von aktiviertem Protein C bei dessen proteolytischem Abbau der Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa.

5 Ein angeborener oder erworbener Mangel an Protein S kann zu thromboembolischen Komplikationen führen.

Protein S wird in der Leber synthetisiert (Stern, D. et al. (1986) J. Cell Biol. 102, 1971-1978). Die Biosynthese ist Vitamin K-abhängig und damit die Konzentration im Blut bei der Therapie mit Vitamin-K-Antagonisten verringert. Der Beginn einer Therapie kann, beim Vorliegen eines Protein S-Mangels, zu  
10 schweren Gesundheitsbeeinträchtigungen beim Patienten führen (Grimaudo, V. et al. (1989) BMJ 298, 233-234).

Ebenfalls verringert sein kann die Aktivität bei disseminierter intravasaler Gerinnung oder thromboembolischen Erkrankungen.

Aus den oben aufgeführten Befunden wird deutlich, daß Protein S einen entscheidenden Einfluß auf die  
15 Funktionsfähigkeit des Protein C/Thrombomodulin-Inhibitorsystems hat und ein entsprechender Bedarf für ein zuverlässiges Diagnosesystem besteht. Protein S kommt in Plasma nur zu etwa 40% in freier Form vor. Der Rest von ca. 60% befindet sich in einem Komplex mit dem C4b- bindenden Protein (Dahlbäck, B. (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. 78, 2512-2516).

Dieses gebundene Protein S ist nicht als Kofaktor für aktiviertes Protein C verfügbar und daher nicht  
20 antikoagulatorisch wirksam. Ein überhöhter Anteil gebundenes Protein S kann sich deshalb ebenfalls als ein funktioneller Mangel zeigen, während das Antigen als normal oder annähernd normal gefunden wird (Comp, P.C. et al. (1986), Blood 67, 504-508; Girolami, S. et al. (1989), Thromb. Haemost. 61, 144-147).

Andererseits kann bei erniedrigtem Protein S-Antigen die Aktivität normal sein, wenn nur ein sehr geringer Teil in der inaktiven gebundenen Form vorliegt, so wie es üblicherweise bei Neugeborenen der Fall  
25 ist (Schwarz, H.P. et al. (1988), Blood 71, 562-565).

Bekannt ist es, Protein S immunologisch zu bestimmen. Diese Methoden lassen aber keine Aussage über die Aktivität des Proteins zu und sind nicht Gegenstand der Erfindung.

Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Protein S sind ebenfalls beschrieben.

Die DE 3724443 A1 beschreibt ein Verfahren zur Bestimmung der Aktivität von Protein S. Dieser Test  
30 setzt relativ komplexe Reagenzien, wie ein synthetisches Substratplasma, gereinigten Faktor Xa und Prothrombin voraus und ist in der Durchführung durch die Inkubationszeiten umständlich. Er wird auch z.B. durch Heparin in der Probe gestört.

In der DE 3607559 A1 ist eine funktionelle Bestimmung von Protein S in Kombination mit Protein C erwähnt. Es ist erforderlich für jede Probe einen Bezugswert ohne Protein C Aktivator zu bestimmen. Der  
35 Einsatz eines Aktivators von F VII oder F II wird ebenfalls beansprucht, aber keine weiteren Belege aufgezeigt. Angaben über die zu erwartenden Meßwerte oder Störeinflüsse für alle Testsysteme werden nicht gemacht.

Ein funktioneller Test wird von Comp, P.C. et al. in J. Clin. Invest. 74, 2082-2088 (1984) beschrieben. Hier wird die Verlängerung der Gerinnungszeit im 1-Stufen Faktor Xa-Test durch aktiviertes Protein C  
40 gemessen. Dieser Test ist relativ sensitiv mit einer Verlängerung von nur 24 sec für die mit diesem Verfahren maximale, meßbare Konzentration von 50%. Plasmen von Patienten unter Vitamin K-Antagonisten-Therapie oder mit Leberschäden waren nicht meßbar.

Bertina et al. (Thromb. Haemost. 1985, 53 (2), 268-272) zeigen eine Möglichkeit auf, funktionelles Protein S in Humanplasma zu bestimmen. Der Test ist jedoch insofern nicht quantitativ für Protein S  
45 auswertbar, da keine Kontrolle des endogenen Faktor VIII oder Faktor V im zu messenden Plasma möglich ist und von diesen beiden Faktoren die Verlängerungen entscheidend abhängen. Liegen diese Faktoren in erhöhter oder erniedrigter Konzentration in der Probe vor, so ergeben sich dementsprechend erniedrigte oder erhöhte Befunde für Protein S.

Van de Waart et al. (1987, Thromb. Res. 48, 427-437) benutzen ein System aus adsorbierten  
50 Substratplasma, zugesetztem Prothrombin, aktiviertem Protein C, Phospholipiden und Calciumchlorid. 100% Differenz im Protein S-Gehalt der Probe bewirken nur ca. 20 Sekunden Verlängerung, d.h. der Test ist ebenfalls relativ unempfindlich.

Suzuki K. und Nishioka J. (1988, Thromb. Res. 49, 241 - 251) beschreiben ein weiteres Testsystem. Sie benutzen Protac<sup>(R)</sup>, einen Aktivator für Protein C aus Schlangengift. Dieses Verfahren ist ebenfalls zeitrau-  
55 bend und umständlich. Die Empfindlichkeit ist mit einer Verlängerung von 13 sec für 100% Aktivitätsdifferenz sehr gering.

Kobayashi I. et al. (1989, Clin. Chem. 35, 1644-1648) stellen auch einen Protein S-Test vor, der ebenfalls eine Bestimmung über eine modifizierte aPTT-Bestimmung darstellt.

Den bisher bekannten Testverfahren ist gemeinsam, daß sie, neben einer umständlichen Handhabung wegen der Vielzahl der verwendeten Reagenzien nur eine geringe Sensitivität aufweisen, deren Maß die Verlängerung der Reaktionszeit in Bezug auf die Höhe der Protein S Aktivität ist.

Der Erfindung lag deshalb die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren sowie ein Reagenz zu entwickeln, das die Aktivität von Protein S in Plasma sowohl einfach als auch zuverlässig, empfindlich und spezifisch zu bestimmen erlaubt.

Erfindungsgemäß wird nun ein Verfahren zur Bestimmung von Protein S durch die Bestimmung der Gerinnungszeit einer biologischen Probe aufgezeigt, wobei die Menge der zugesetzten Aktivatoren so eingestellt ist, daß die Gerinnungszeit über die normale Gerinnungszeit hinaus verlängert ist.

Durch die Verlängerung der Gerinnungszeit konnte auf überraschend einfache Weise eine sehr große und darüberhinaus den Erfordernissen anpaßbare Empfindlichkeitssteigerung erzielt werden.

Verfahren zur Bestimmung der Gerinnungszeit sind dem Fachmann an sich bekannt. Es kann sich dabei u. a. um Verfahren handeln, die die Freisetzung von Thrombin aus Prothrombin über die Entstehung eines Gerinnsels oder die Umsetzung eines chromogenen Substrates bestimmen. Bevorzugt ist dabei das chromogene Verfahren, ganz besonders bevorzugt die Verwendung eines chromogenen Thrombinsubstrates, insbesondere von Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA.

In einer bevorzugten Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die unverdünnte Probe mit einem Überschuß an Protein S Mangelplasma versetzt und dann die Gerinnungszeit durch Zumischen eines Reagenzes bestehend aus aktiviertem Protein C, einem Aktivator des exogenen oder endogenen Weges der Gerinnung, Phospholipiden,  $\text{Ca}^{++}$ , einem chromogenen Substrat für Thrombin sowie einer Heparin neutralisierenden Substanz bestimmt. Das aktivierte Protein C kann auch separat kurz vor dem restlichen Reagenz zur Probe gegeben werden.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird die unverdünnte Probe mit dem 4 bis 10fachen Volumen an Protein S-Mangelplasma versetzt. Die Gerinnungsreaktion wird durch Zumischung (das 5 bis 10fache des Probenvolumens) eines Reagenz aus aktiviertem Protein C (1 bis 50 pmol/ml), einem Aktivator des Gerinnungssystems, bevorzugterweise ein Thromboplastin oder eine Schlangengiftprotease, Phospholipiden (5-300 ppm (w/v)) z. B. Cephalin, Calciumionen (2-10 mmol/l) bevorzugterweise  $\text{CaCl}_2$ , eine Heparin neutralisierende Substanz, wie z. B. Polybren (0.1-10 µg/ml) sowie ein chromogenes Thrombinsubstrat, wie z. B. Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA gestartet. Gemessen wird die Zeit von der Zugabe des Reagenz bis zum Erreichen einer bestimmten Extinktion (z. B. 0.1) im Absorptionsoptimum (z.B. 405 nm) des freigesetzten Chromophors.

Die Aktivatorkonzentration, die unter den gegebenen Reaktionsbedingungen eine Gerinnungszeit (ohne Protein S) von mindestens 50 sec. gewährleistet, kann jeweils durch einfache Versuche ermittelt werden.

Ganz besonders bevorzugt sind Verfahren und Reagenzien, die in den Beispielen beschrieben sind.

Die Gerinnungszeit wird bei der Verwendung eines chromogenen Substrates bevorzugterweise dadurch bestimmt, daß die Zeit von der Zugabe des Reagenz bis zum Erreichen einer bestimmten Extinktion im Absorptionsoptimum des freigesetzten Chromophors bestimmt wird. Zur Auswertung wird zweckmäßigerweise eine Kalibrierungskurve erstellt, indem Verdünnungen eines Poolplasmas (z.B. 100%, 75%, 50%, 25%, 12,5% 10%) in den Test eingesetzt und die Gerinnungszeiten festgestellt werden.

Die biologische Probe kann bevorzugterweise Plasma humanen Ursprungs sein, besonders bevorzugt ist dabei die Verwendung unverdünnter Proben.

Ein geeignetes Protein S-Mangelplasma kann, nach dem Fachmann an sich bekannten Verfahren, z. B. immunadsorptiv gewonnen werden. Faktor VIII wird, falls notwendig, durch Zugabe von gereinigtem Faktor VIII eingestellt. Der Faktor V kann gegebenenfalls durch Zugabe eines Protein-S Mangelplasmas aus Kaninchen, welches große Mengen an Faktor V enthält, eingestellt werden. Bevorzugterweise ist das Volumenverhältnis von Probe zu Protein S Mangelplasma 1 : 4 bis 1 : 10.

Bevorzugterweise weist das Mangelplasma einen Gehalt an Faktor V von etwa 20 bis 100 %, besonders bevorzugterweise von 50 - 80 % auf.

Protein C kann nach verschiedenen beschriebenen Verfahren aus Plasma gereinigt (z.B. Bajaj S.P. et al. (1983) Preparative Biochemistry 13(3) 191-214) oder durch biotechnologische Verfahren hergestellt werden. Das gereinigte Protein C kann mittels PROTAC<sup>(R)</sup> oder Thrombin, welche an ein Trägermaterial, wie Sepharose, gekoppelt wurden, aktiviert werden oder es kann über gentechnologische Verfahren direkt gewonnenes aktiviertes Protein C (Ehrlich H.J. et al., J. Biol. Chem. 264 (24) 14298-14309) eingesetzt werden. Die Konzentration an aktiviertem Protein C im Test liegt zweckmäßigerweise zwischen 1 und 50 pmol/ml.

Bevorzugterweise kann ein, durch eine Schlangengiftprotease aus dem Gift der Agkistrodon contortrix aktiviertes Protein C eingesetzt werden.

Aktivatoren des Gerinnungssystems sind dem Fachmann an sich bekannt. Aktivatoren im Sinne dieser

Erfindung können auch Schlangengiftproteasen und aktivierte Faktoren der Gerinnungskaskade, wie z. B. Faktor VIIa, IXa und Xa, sein. Bevorzugterweise können Proteasen aus dem Gift von *Vipera russellii*, Sulfatide, Ellagsäure, Thromboplastine und/oder Silica-Partikel eingesetzt werden (SHIMADA T. et al. (1985) J. Biochem. 97, 429 - 439). Die optimale Konzentration der jeweiligen Aktivatoren kann durch einfache

5 Versuche ermittelt werden.

Phospholipide sind eine bekannte Klasse von Stoffen, die nach dem Fachmann an sich bekannten Verfahren hergestellt werden können oder im Handel zu erwerben sind. Bevorzugt sind Konzentrationen von 5-300 ppm (w/v) im Testansatz.  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen können vorteilhafterweise durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  erzeugt werden. Bevorzugt sind Konzentrationen von 2 - 10 mM im Testansatz.

10 Heparin neutralisierende Substanzen sind eine dem Fachmann bekannte Klasse von Verbindungen, wie z. B. Polybren, Protamin-Chlorid, Protamin-Sulfat.

Die Reaktion kann bei 15 - 40 °C, bevorzugterweise bei 20 - 40 °C, ganz bevorzugterweise bei 37 °C durchgeführt werden.

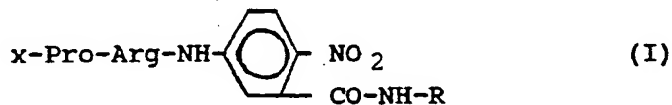
Es wurde gefunden, daß im beschriebenen Test das im Plasma vorliegende Protein S sensitiv und  
15 spezifisch gemessen werden kann (Tabelle 1). Keinen Einfluß haben Konzentrationsänderungen von Faktor VIII zwischen 50 und 150%, der Vitamin K-abhängigen Gerinnungsfaktoren wie Prothrombin oder Protein C (50-150%), außer Protein S selbst, oder die Anwesenheit von Heparin bis zu 0.4 U/ml. Der Faktor V Gehalt der Probe zeigt erwartungsgemäß einen gewissen Einfluß, da durch den Gehalt im Protein S-Mangelplasma Schwankungen in der Probe nicht völlig ausgeglichen werden können und die Inhibition dieses Faktors ein  
20 Maß für die Aktivität des Protein S ist.

Die Erfindung betrifft ferner ein Reagenz zur Bestimmung von Protein S nach dem erfindungsgemäßen Verfahren, wobei die Gerinnungszeit einer Probe ohne Protein S mindestens 50 Sekunden beträgt.

Bevorzugt sind dabei Reagenzien, die als Aktivator eine Protease aus dem Gift von *Vipera russellii* sowie Reagenzien, die als Aktivator ein Thromboplastin enthalten.

25 Bevorzugt sind auch Reagenzien, die ein chromogenes Thrombinsubstrat der allgemeinen Formel I enthalten

30



35 wobei

R C1-5-Alkyl oder  $\text{-CH}[\text{CH}(\text{CH}_3)_2]\text{COOCH}_3$  und  
X H-D-Phe-, Boc-Gly oder Tosyl-Gly ist.

40

45

50

55

Tabelle 1: Spezifität des Tests zur funktionellen  
Bestimmung von Protein S

geänderter Parameter	Konzentration	gefundene Protein S Aktivität
Kontrolle		100,0 %
Heparin	0.1 U/ml	102 %
Heparin	0.2 U/ml	97 %
Heparin	0.3 U/ml	109 %
Heparin	0.4 U/ml	109 %
Heparin	0.5 U/ml	132 %
Heparin	1.0 U/ml	> 150 %
F V	50 %	114 %
F V	75 %	111 %
F V	100 %	100 %
F V	125 %	96 %
F V	150 %	91 %
F VIII	50 %	106 %
F VIII	75 %	99 %
F VIII	100 %	98 %
F VIII	125 %	103 %
F VIII	150 %	104 %
Protein C	50 %	96 %
Protein C	100 %	100 %
Protein C	150 %	103 %

Die folgenden Beispiele dienen der Erläuterung der Erfindung und sollen sie in keiner Weise einschränken.

#### Beispiel 1

Herstellung eines gebrauchsfertigen Reagenz auf der Basis eines aPTT-Reagenzes

Zu einem aPTT-Reagenz (Partochrom<sup>®</sup>, Behringwerke AG, D-3550 Marburg), bestehend aus Phospholipid, Sulfatid, Polybren, einem chromogenen Thrombinsubstrat (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-isopropylamid) und Hepes, pH 7.6, werden 0.5 Einheiten aktiviertes Protein C und 10 µg Polybren zugegeben und das Gemisch auf 37 °C erwärmt. Das Reagenz ist damit gebrauchsfertig.

## Beispiel 2

Herstellung eines gebrauchsfertigen Reagenz auf der Basis eines PT-Reagenzes

- 5 Zu einem PT-Reagenz (Behringwerke AG, D-3550 Marburg), bestehend aus Phospholipid, einem niedrig konzentrierten Thromboplastin, einem chromogenen Thrombinsubstrat (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-isopropylamid) und Hepes, pH 7.4, werden 0.5 Einheiten aktiviertes Protein C zugegeben und das Gemisch auf 37 °C erwärmt. Das Reagenz ist damit gebrauchsfertig.

## 10 Beispiel 3

Herstellung eines gebrauchsfertigen Reagenzes auf der Basis eines Aktivators aus einem Schlagengift

- 15 Zu einem Puffer bestehend aus Phospholipid, einem chromogenen Thrombinsubstrat (Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-isopropylamid), einem Heparinantagonisten (Polybren), Natriumchlorid und Hepes, pH 7.0, werden 40 ng/ml eines Schlangengiftes von Vipera russellii gegeben und das Reaktionsgemisch auf 37 °C erwärmt. Das Reagenz ist damit gebrauchsfertig.

## Beispiel 4

- 20 Bestimmung des Protein S-Gehalts in Plasma

- Zur Kalibrierung werden Verdünnungen eines Normalplasmas in phosphatgepufferter, isotonischer Kochsalzlösung von 100%, 75%, 50%, 25%, 10% und 0% hergestellt. Die Messung der Standards und der
- 25 Proben erfolgt wie nachstehend beschrieben:

In eine Küvette werden pipettiert:

- 10 µl Probe  
50 µl Protein S-Mangelplasma  
500 µl Reagenz gemäß

- 30 a) Beispiel 1  
b) Beispiel 2

- Mit der Zugabe des Reagenz wird eine Uhr gestartet und die Extinktion bei 405 nm verfolgt bis ein Anstieg in der Absorption um einen bestimmten Wert (z.B. von 0,1) erreicht worden ist. Die Verlängerung der Gerinnungszeit über den Wert für 0% Protein S hinaus ist der Konzentration an Protein S in der Probe
- 35 proportional (Fig. 1).

Die Daten für die Bestimmung gemäß dem in DE 37 24 443 beschriebenen Verfahren sind der Offenlegungsschrift DE 37 24 443 A1, Figur 1, entnommen.

## Beispiel 5

- 40 Bestimmung des Protein S-Gehalts in Plasma mit getrennter Zugabe von aktiviertem Protein C

- Zur Kalibrierung werden Verdünnungen eines Normalplasmas in Saline von 100%, 75%, 50%, 25%, 10% und 0% hergestellt. Die Messung der Standards und der Proben erfolgt wie nachstehend beschrieben:

- 45 In eine Küvette werden pipettiert:

- 10 µl Probe  
50 µl Protein S-Mangelplasma  
25 µl aktiviertes Protein C  
500 µl Reagenz gemäß Beispiel 3

- 50 Mit der Zugabe des Reagenz wird eine Uhr gestartet und entweder die Extinktion bei 405 nm verfolgt bis ein Anstieg in der Absorption um einen bestimmten Wert (z.B. von 0,1) erreicht wird oder das Eintreten einer Gerinnung gemessen. Die Verlängerung der Gerinnungszeit über den Wert für 0% Protein S hinaus ist der Konzentration an Protein S in der Probe proportional (Fig. 2).

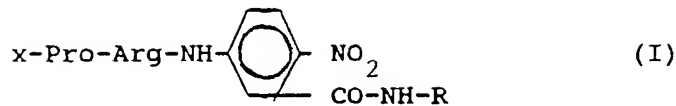
## 55 Patentansprüche

1. Verfahren zur Bestimmung von Protein S durch die Bestimmung der Gerinnungszeit in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge der zugesetzten Aktivatoren so eingestellt ist,



daß die Gerinnungszeit über die normale Gerinnungszeit hinaus verlängert ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einem Überschuß an Protein S-Mangelplasma versetzt und nach Zumischen eines Reagenzes, bestehend aus einem Aktivator der Gerinnung, Calcium-Ionen, Phospholipiden, aktiviertem Protein C, einem Inhibitor für Heparin und gegebenenfalls einem chromogenen Peptidsubstrat für Thrombin, die Zeit gemessen wird, bis ein festgelegter Extinktionsanstieg im Absorptionsoptimum des freien Chromophors erreicht wird oder die Gerinnung eintritt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einem Überschuß an Protein S-Mangelplasma vorgelegt und nach der separaten Zugabe von aktiviertem Protein C durch Zugabe eines Reagenz, bestehend aus einem Aktivator der Gerinnung, Calcium-Ionen, Phospholipiden, einem Inhibitor für Heparin und einem chromogenen Peptidsubstrat für Thrombin, die Zeit gemessen wird, bis ein festgelegter Extinktionsanstieg im Absorptionsoptimum des freien Chromophors erreicht wird oder die Gerinnung eintritt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die unverdünnte Probe mit dem 4 bis 10fachen Volumen an Protein-S Mangelplasma versetzt wird, die Gerinnungsreaktion wird gestartet durch Zumischung (das 5 bis 10fache des Probenvolumens) eines Reagenz aus aktiviertem Protein C (1 bis 50 µmol/ml), einem Aktivator des Gerinnungssystems, bevorzugterweise ein Thromboplastin oder eine Schlangengiftprotease, Phospholipiden (5-300 ppm (w/v)) z. B. Cephalin, Calciumionen (2-10 mmol/l) bevorzugterweise CaCl<sub>2</sub>, einer Heparin neutralisierenden Substanz, wie z. B. Polybren (0.1-10 µg/ml) sowie einem chromogenen Thrombinsubstrat, wie z. B. Tos-Gly-Pro-Arg-ANBA-IPA. Gemessen wird die Zeit von der Zugabe des Reagenz bis zum Erreichen einer bestimmten Extinktion (z. B. 0.1) im Absorptionsoptimum (z.B. 405 nm) des freigesetzten Chromophors.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gerinnungszeit mit Hilfe eines chromogenen Substrats bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Mangelplasma einen Gehalt an Faktor V von 20 bis 100% aufweist.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein C durch eine Schlangengiftprotease aus dem Gift der Schlange Agkistrodon contortrix aktiviert wurde.
8. Reagenz zur funktionellen Bestimmung von Protein S durch die Bestimmung der Gerinnungszeit in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, daß die Gerinnungszeit in Abwesenheit von Protein S mindestens 50 Sekunden beträgt.
9. Reagenz gemäß Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es unter anderem enthält: aktiviertes Protein C, einen Aktivator des exogenen oder endogenen Weges der Gerinnung, Phospholipide, Calcium-Ionen, gegebenenfalls ein chromogenes Substrat für Thrombin sowie eine Heparin neutralisierende Substanz.
10. Reagenz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Aktivator eine Protease aus dem Gift einer Schlange oder das umfraktionierte Schlangengift ist.
11. Reagenz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als Aktivator ein Thromboplastin eingesetzt wird.
12. Reagenz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Aktivator ein Sulfatid oder ein Gemisch aus Sulfatiden ist.
13. Reagenz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Heparininhibitor Polybren ist.
14. Reagenz nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß als chromogenes Thrombinsubstrat eine Verbindung der allgemeinen Formel I eingesetzt wird



5

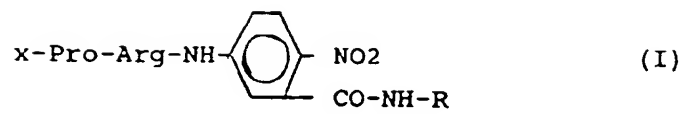
wobei

R C<sub>1-5</sub>-Alkyl oder -CH[CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]COOCH<sub>3</sub> und

10 X H-D-Phe-, Boc-Gly oder Tosyl-Gly ist.

**Patentansprüche für folgenden Vertragsstaat:ES**

1. Verfahren zur Bestimmung von Protein S durch die Bestimmung der Gerinnungszeit in einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, daß die Menge der zugesetzten Aktivatoren so eingestellt ist, daß die Gerinnungszeit über die normale Gerinnungszeit hinaus verlängert ist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einem Überschuß an Protein S-Mangelplasma versetzt und nach Zumischen eines Reagenzes, bestehend aus einem Aktivator der Gerinnung, Calcium-Ionen, Phospholipiden, aktiviertem Protein C, einem Inhibitor für Heparin und gegebenenfalls einem chromogenen Peptidsubstrat für Thrombin, die Zeit gemessen wird, bis ein festgelegter Extinktionsanstieg im Absorptionsoptimum des freien Chromophors erreicht wird oder die Gerinnung eintritt.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Probe mit einem Überschuß an Protein S-Mangelplasma vorgelegt und nach der separaten Zugabe von aktiviertem Protein C durch Zugabe eines Reagenz, bestehend aus einem Aktivator der Gerinnung, Calcium-Ionen, Phospholipiden, einem Inhibitor für Heparin und einem chromogenen Peptidsubstrat für Thrombin, die Zeit gemessen wird, bis ein festgelegter Extinktionsanstieg im Absorptionsoptimum des freien Chromophors erreicht wird oder die Gerinnung eintritt.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die unverdünnte Probe mit dem 4 bis 10fachen Volumen an Protein-S Mangelplasma versetzt wird, die Gerinnungsreaktion wird gestartet durch Zumischung (das 5 bis 10fache des Probenvolumens) eines Reagenz aus aktiviertem Protein C (1 bis 50 µmol/ml), einem Aktivator des Gerinnungssystems, bevorzugterweise ein Thromboplastin oder eine Schlangengiftprotease, Phospholipiden (5-300 ppm (w/v)) z. B. Cephalin, Calciumionen (2-10 mmol/l) bevorzugterweise CaCl<sub>2</sub>, einer Heparin neutralisierenden Substanz, wie z. B. Polybren (0.1-10 µg/ml) sowie einem chromogenen Thrombinsubstrat, wie z. B. Tos-GlyPro-Arg-ANBA-IPA. Gemessen wird die Zeit von der Zugabe des Reagenz bis zum Erreichen einer bestimmten Extinktion (z. B. 0.1) im Absorptionsoptimum (z.B. 405 nm) des freigesetzten Chromophors.
5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gerinnungszeit mit Hilfe eines chromogenen Substrats bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Mangelplasma einen Gehalt an Faktor V von 20 bis 100% aufweist.
7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein C durch eine Schlangengift Protease aus dem Gift der Schlange Agkistrodon contortrix aktiviert wurde.
8. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Gerinnungszeit in Abwesenheit von Protein S mindestens 50 Sekunden beträgt.
9. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Aktivator eine Protease aus dem Gift einer Schlange oder das umfraktionierte Schlangengift ist.
10. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß als chromogenes Thrombinsubstrat eine Verbindung der allgemeinen Formel I eingesetzt wird



wobei  
R C1-5-Alkyl oder -CH[CH(CH3)2]COOCH3 und  
10 X H-D-Phe-, Boc-Gly oder Tosyl-Gly ist.

15

20

25

30

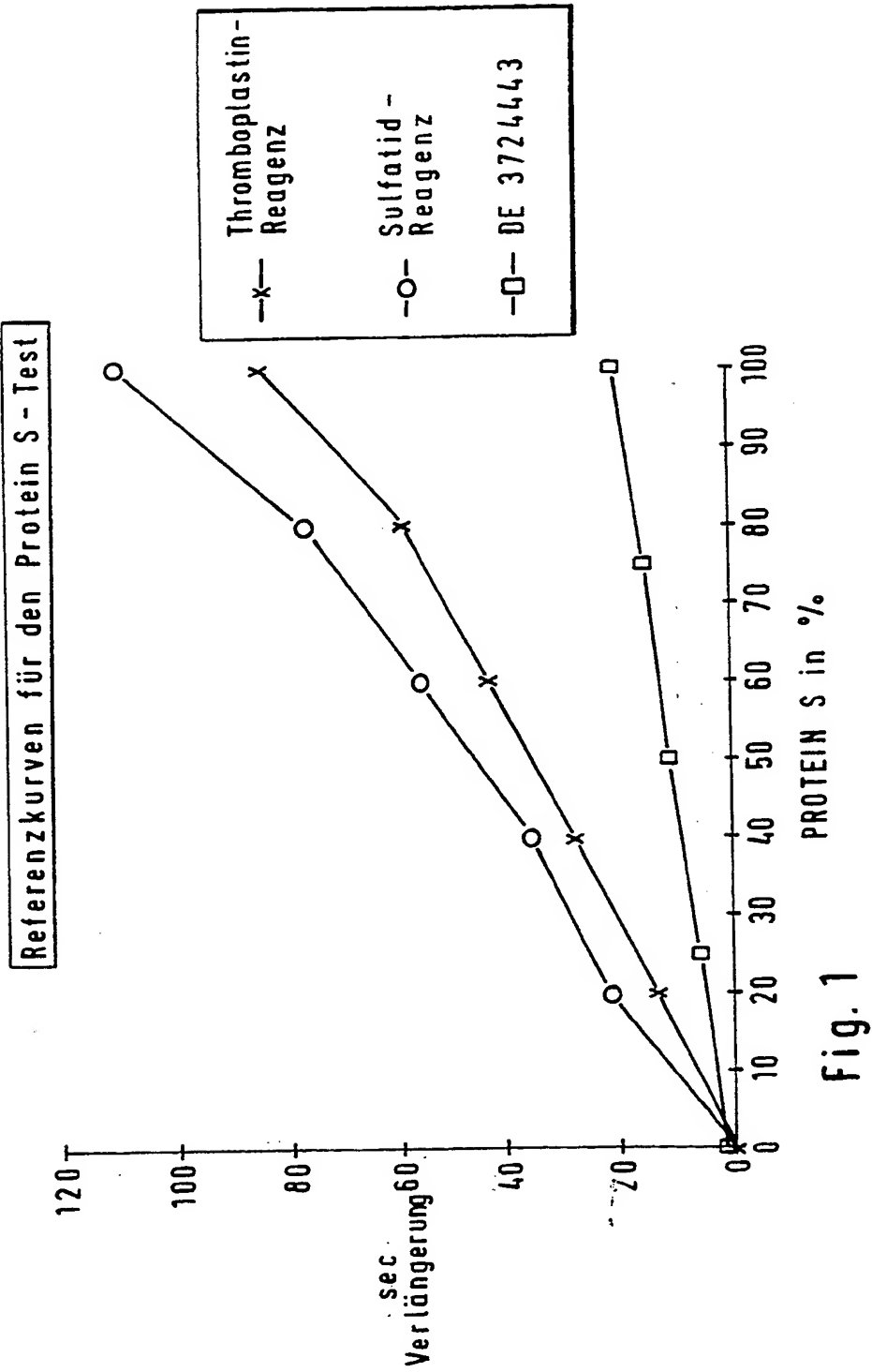
35

40

45

50

55



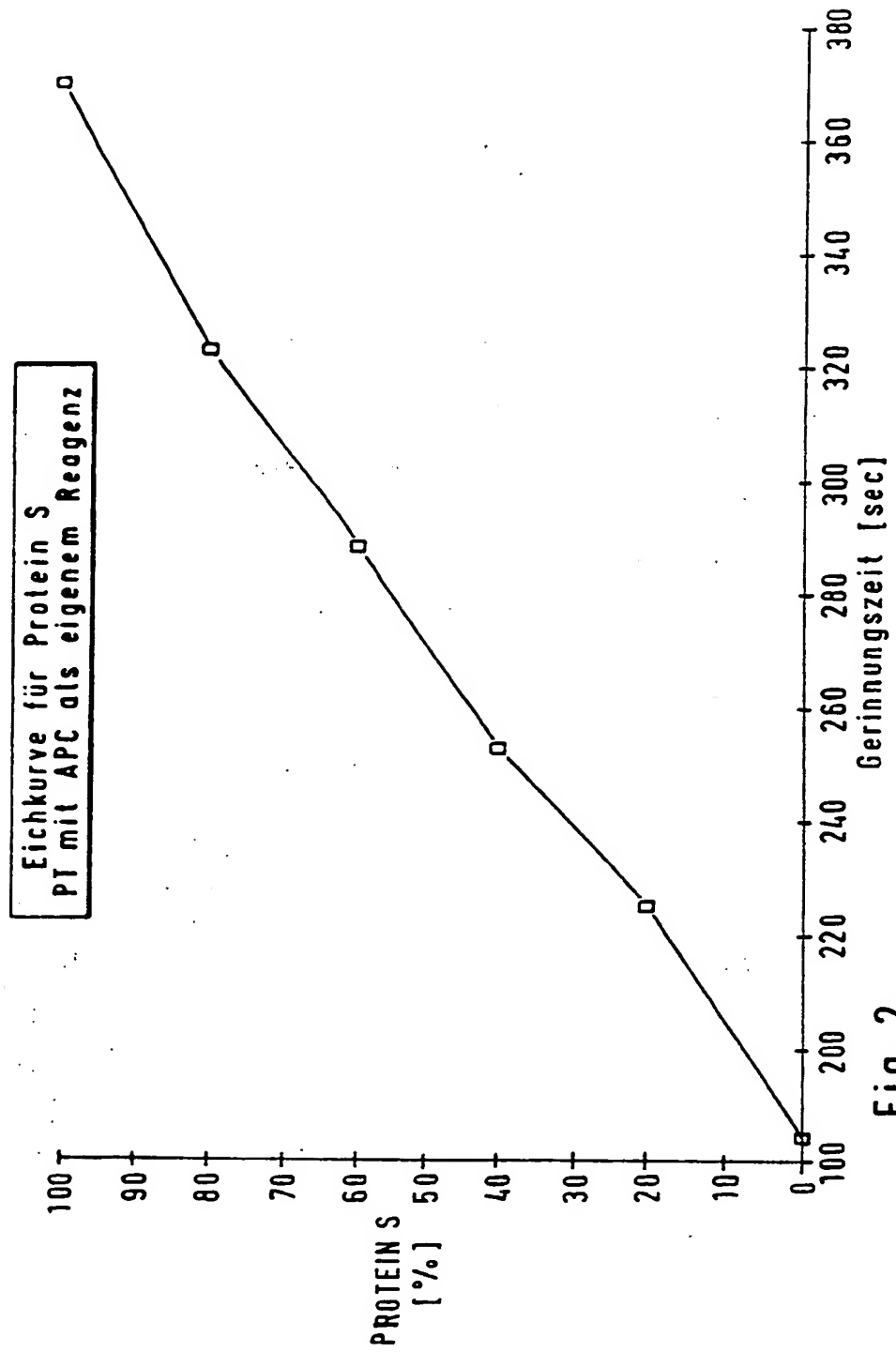


Fig. 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



Europäisches Patentamt  
European Patent Office  
Office européen des brevets



Veröffentlichungsnummer: **0 445 626 A3**

12

## EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

21 Anmeldenummer: 91102805.8

51 Int. Cl. 5: G01N 33/86, C12Q 1/56

22 Anmeldetag: 26.02.91

30 Priorität: 03.03.90 DE 4006634

43 Veröffentlichungstag der Anmeldung:  
11.09.91 Patentblatt 91/37

84 Benannte Vertragsstaaten:  
AT BE CH DE DK ES FR GB IT LI NL SE

88 Veröffentlichungstag des später veröffentlichten  
Recherchenberichts: 03.06.92 Patentblatt 92/23

71 Anmelder: BEHRINGWERKE  
Aktiengesellschaft  
Postfach 1140  
W-3550 Marburg 1(DE)

72 Erfinder: Fickenscher, Karl, Dr.  
Sonnenweg 8  
W-3550 Marburg(DE)

74 Vertreter: Fischer, Hans-Jürgen, Dr. et al  
Hoechst AG Zentrale Patentabteilung  
Postfach 80 03 20  
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

54 Funktioneller Test zur Bestimmung der Protein S-Aktivität.

57 Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur funktionellen Bestimmung von Protein S in Flüssigkeiten, insbesondere in Plasma, sowie ein hierfür geeignetes Reagenz.

EP 0 445 626 A3



Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 10 2805  
PAGE1

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. CL.5)
D,X	CLINICAL CHEMISTRY, Bd. 35, Nr. 8, 1989, WINSTON US Seiten 1644 - 1648; NOBAYASHI ET AL.: 'Functional activity of protease 3 determined with use of protein C activated by venom activator' * Seite 1644 - Seite 1645; Abbildung 1 *	1-3,7-10	G01N33/86 C12Q1/56
D,Y	---	4,5, 12-14	
Y	EP-A-0 123 083 (BOEHRINGER AKTIENGESELLSCHAFT) * Ansprüche 2,3 *	4,5,12, 14	
Y	EP-A-0 158 254 (BOEHRINGER AKTIENGESELLSCHAFT) * Ansprüche 3,7 *	4,13	
X	EP-A-0 236 985 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) * Ansprüche *	1-3,5,7	
A	---	4,9-11, 14	
D	& DE-A-3 607 559		RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. CL.5)
D,X	JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION Bd. 74, Dezember 1984, Seiten 2082 - 2088; COMP ET AL.: 'Familial protein S deficiency is associated with recurrent thrombosis' * Seite 2084 - Seite 2085; Tabelle I *	1-3	G01N C12Q
D,X	THROMBOSIS RESEARCH Bd. 48, Nr. 4, 1987, Seiten 427 - 437; WAART ET AL.: 'A functional test for protein S activity in plasma' * Seite 428 - Seite 429; Tabelle 1 *	1-3	
	---		
	-/--		
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
BERLIN	30 MAERZ 1992	CEDER O.	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		I: der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E: älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D: in der Anmeldung angeführtes Dokument L: aus anderen Gründen angeführtes Dokument A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur	
X: von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y: von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A: technologischer Hintergrund O: mündliche Offenbarung P: Zwischenliteratur		A: Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	





Europäisches  
Patentamt

# EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 91 10 2805  
PAGE2

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrifft Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.5)
X	WORLD PATENTS INDEX LATEST Week 8914, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 89-103936 & JP-A-1 050 960 (YAMANOCHI PHARM KK) 27. Februar 1989 * Zusammenfassung *	1-3	
X	WORLD PATENTS INDEX LATEST Week 8734, Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 87-237651 & JP-A-62 159 048 (EIKEN KAGAKU KK) 15. Juli 1987 * Zusammenfassung *	1	
P, X	EP-A-0 406 971 (INSTRUMENTATION LABORATORY SPA) * das ganze Dokument *	1-3, 7-10	
			RECHERCHIERTE SACHGEBIETE (Int. Cl.5)
Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt			
Recherchenort BERLIN		Abschlußdatum der Recherche 30 MAERZ 1992	Prüfer CEDER O.
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus andern Gründen angeführtes Dokument * : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung als als betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : mündliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			

